



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

INFORME TÉCNICO N° 2 – COMITÉ CIENTÍFICO PERMANENTE CUBRA (16/06/2020)

Objetivos e interpretación de pruebas diagnósticas y de seguimiento para SARS-Cov-2

Introducción

El papel del BIOQUIMICO en esta pandemia es fundamental y va más allá del diagnóstico etiológico de COVID-19. El laboratorio de análisis clínicos es quien realiza el control de los pacientes a través de las pruebas diagnósticas y es fundamental para evaluar la gravedad y progresión de la enfermedad, así como para monitorear la intervención terapéutica. Además del diagnóstico, el laboratorio está implicado en el control y evaluación de la progresión de la enfermedad COVID-19, proporcionando potencialmente información de pronóstico importante.

A continuación, desde CUBRA se aborda el tema de los diferentes métodos de diagnóstico y/o estudio de COVID-19, dejando una vez más asentado que todas estas determinaciones deberán estar en manos de un profesional de la Bioquímica, preservando las buenas prácticas del laboratorio bajo estrictas normas de calidad y condiciones de bioseguridad.

1. Métodos de Diagnóstico molecular:

1.1- PCR real time: Reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-qPCR)

La PCR es una técnica molecular que se utiliza ampliamente tanto en investigación como en la clínica. La RT-qPCR detecta ARN y es lo que se está utilizando actualmente para detectar SARS-CoV-2, el virus que causa COVID-19, y prueba directamente la presencia de ARN del virus.

Para medir el ARN viral, se convierte en ADN, se copia muchas veces utilizando ciclos de temperatura repetidos y luego se utilizan marcadores fluorescentes para detectar el virus.

La RT-qPCR detecta si el ARN viral está presente o no en las muestras de un paciente. Lo hace capturando y amplificando regiones del material genético del virus. Los genes virales N, E, S y RdRp son los testeados actualmente según el documento de la OMS sobre pruebas de laboratorio para la enfermedad coronavirus en casos humanos sospechosos (COVID-19) (WHO, Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

suspected human cases: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019/technical-guidance/laboratory-guidance>)

Se recomienda usar métodos que incorporen control de extracción, que no sólo garantizan que la extracción fue óptima sino que además permite monitorear la correcta obtención, conservación y transporte del tubo, permitiendo evitar falsos negativos

Lo ideal de la PCR es que cumpla con los requisitos de OMS (detección de dos o más genes) y del Colegio Americano de Patólogos (CAP) (que tenga control de extracción en el mismo pocillo en el que se hace la amplificación del target) lo que agiliza notoriamente el ritmo de obtención de resultados, de claro beneficio en este momento.

Ventajas:

- RT-qPCR es un procedimiento sólido.
- RT-qPCR detecta infección actual de la enfermedad

Desventajas

- RT-qPCR se basa en la captura y detección del virus y, por lo tanto, no detecta pacientes recuperados.
- El tipo de muestra es crítico: el virus se distribuye en el tracto respiratorio de diferente manera según el paciente, por lo que el virus puede detectarse en el esputo o el hisopo nasofaríngeo, pero no necesariamente en ambos lugares al mismo tiempo.

1.2- Amplificación Isotérmica Mediada por Bucle (LAMP)

La reacción de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es una nueva técnica de amplificación de ácido nucleico que amplifica el ADN con alta especificidad, eficiencia y rapidez en condiciones isotérmicas. Este método se desarrolla a una temperatura constante de 60-65 ° C. LAMP tiene una alta especificidad y sensibilidad y es simple de realizar; por lo tanto, poco después de su desarrollo inicial se convirtió en un método de amplificación isotérmica enormemente popular en biología molecular, con aplicación en la detección de patógenos.

Al igual que RT-qPCR, LAMP detecta si el ARN viral está presente o no en las muestras de un paciente. Lo hace capturando y amplificando regiones del material genético del virus, generalmente S, N y E. La cantidad de ADN producido en LAMP es mucho mayor que en RT-qPCR y se puede ver visualmente un resultado positivo de la prueba dado que la detección es colorimétrica.



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

La realización de pruebas con este kit exige realizar ensayos rigurosos en cuanto al límite de detección ya que la detección es colorimétrica y esto, cuando no es evidente, se vuelve subjetivo al ojo del operador.

Ventajas:

- *LAMP es una técnica que puede producir resultados en 2-3 horas.*
- *LAMP detecta infecciones actuales*

Desventajas

- *La tecnología es más nueva que la RT-qPCR y aún se está evaluando en entornos clínicos.*
- *Las pruebas LAMP se basan en la captura y detección del virus, por lo que es posible no detectar a los pacientes que han eliminado el virus y se han recuperado de la enfermedad.*

Todos los métodos moleculares deben realizarse en cabina de seguridad biológica tipo II

Etapa Pre analítica en estudios de diagnóstico molecular:

Para la detección de antígenos virales es importante el momento de la toma de muestra para evitar falsos negativos. La misma debe realizarse dentro de las primeras 48-72 hs. del inicio de los síntomas clínicos.

Comúnmente, las muestras se toman usando hisopos largos o cortos, pero se puede recolectar de otras maneras. Recolectar muestras de donde el virus se está diseminando o multiplicando, mejora la precisión de la prueba.

Las muestras recomendadas son:

- Muestra nasofaríngea (NF)
- Muestra de oro-faringe (OF)
- Muestra de esputo / lavado / aspiración nasofaríngea o lavado / aspiración nasal (pacientes internados)

La muestra de hisopado debe realizarse con hisopos estériles de dacron, nylon o poliéster, con mango de plástico, no de madera. Una vez obtenida la muestra, se coloca en el tubo con medio de transporte viral o 2 cc de solución fisiológica estéril, cerrados con tapa a rosca.

Cada muestra debe estar etiquetada con el número de identificación del paciente, se recomiendan al menos dos identificadores.

Conservación y transporte: las muestras se guardan refrigeradas a 2-8 °C hasta 72 h después de la recolección y en envase de bioseguridad exclusivamente identificado como “muestra para detección de COVID-19”



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

hasta su determinación. Si el procesamiento es superior a las 72 hs, se recomienda almacenar las muestras a -70°C

Etapa Post analítica:

Un resultado *positivo* de la PCR significa que la persona de la que se tomó la muestra está actualmente infectada por el virus.

Un resultado *negativo* de la PCR podría significar que la persona no está infectada actualmente por el virus o pueden ser “falsos negativos” debido a que el sitio de la extracción no fue el adecuado, la muestra es de mala calidad o que es demasiado pronto o demasiado tarde en la infección para detectar la replicación del virus.

Control de Calidad

El laboratorio debe contar con controles de calidad externo e interno.

- a. *Externos.* Puede utilizarse las encuestas para COV2 del CAP (dos envíos anuales de tres muestras cada uno) y ponerse en contacto entre laboratorios para poder compartir muestras de pruebas positivas.
- b. *Internos:* cada corrida de PCR cuenta con un control Positivo y uno Negativo y a su vez cada muestra posee un control de extracción agregado antes de extraer los ácidos nucleicos para garantizar que dicho proceso haya sido realizado de forma correcta.

2. Métodos serológicos

El primer informe emitido por CUBRA hace referencia a este tipo de pruebas, que tal como se detalló, tienen fines epidemiológicos. Como se definió, existen métodos rápidos, los denominados Point of Care (POC) y métodos convencionales de medición de anticuerpos. Dentro de los POC, nos referimos a la inmunocromatografía (IC) Estos tipos de pruebas funcionan de manera muy diferente a las técnicas de RT-qPCR y LAMP y detectan la respuesta de anticuerpos del paciente generados en respuesta al virus en lugar de detectar el virus en sí, lo que indica que el paciente está infectado con COVID-19 o, más probablemente, se ha recuperado de la infección.



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

En relación a la investigación de anticuerpos de distintos isotipos, reiterando lo expresado en el primer informe, IgM es la primera en aparecer, como en cualquier infección, pero también la primera en hacerse indetectable. Su utilidad está restringida al breve período en que se negativiza la RT-qCR y comienza a detectarse IgG, que es la inmunoglobulina que persiste mucho tiempo después de la infección, años en muchos casos. Por ello, IgG es la única que tiene utilidad con fines epidemiológicos, para conocer que pacientes pueden haber estado expuestos al virus, con o sin sintomatología.

La detección de IgA como anticuerpo no ha demostrado utilidad en prácticamente ninguna enfermedad infecciosa, por lo que es altamente probable que tampoco lo sea en el caso de Covid 19. A pesar que existen kits para detección de IgA, no se ha demostrado su utilidad y debería quedar restringida a laboratorios de investigación.

La recomendación de este comité es que, con fines epidemiológicos se investiguen solamente anticuerpos tipo IgG o, eventualmente, inmunoglobulinas totales (IgG+IgA+IgM) de los cuales prácticamente entre el 80 y 90% de la actividad de anticuerpo reside en IgG

2.1- **Métodos POC:** Inmunocromatografía o inmunoensayos de flujo lateral (IC)

Los inmunoensayos de flujo lateral para SARS-CoV-2, basados en dispositivos simples, tipo cartuchos o cassettes, detectan dos tipos de anticuerpos; IgM, IgG o ambos. Son de fácil uso, se aplica una muestra de sangre venosa o capilar, se agrega un líquido diluyente y se deja fluir la muestra a través del dispositivo.

Reiterando lo expresado en el primer informe, y dado que con la misma rapidez con que avanzan todos los temas referentes a la pandemia han aparecido publicidades a nuestro juicio reñidas con la ética y que afectan la incumbencia profesional Bioquímica, *“La IC tiene la ventaja de su sencillez operativa pero es subjetiva y no alcanza la Sensibilidad y Especificidad requeridas para garantizar la confiabilidad de los resultados. Por otra parte, se trata de una prueba que, justamente por su sencillez, con frecuencia es presentada como que su realización puede estar en manos de profesionales no bioquímicos o aún autotests”*

Al momento de elegir un método o un kit diagnóstico, se debe prestar atención a los parámetros enunciados, que determinan su confiabilidad y son imprescindibles para la interpretación de los resultados.

Ventajas:

- *Las IC son rápidas, dando resultados en solo 15 minutos.*



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

- *Permiten muestras venosas o capilares, de fácil obtención*

Desventajas

- *Prueba de screening, no confirmatoria*
- *Escasa evidencia sobre su precisión, sensibilidad y especificidad. Resultados altamente subjetivos*
- *No útil para diagnóstico. Solo indican si el paciente ha sido infectado en algún momento, y con las limitaciones expresadas*
- *En general son más costosas que las pruebas de anticuerpos basadas en métodos de mayor especificidad y sensibilidad como ELISA, Quimioluminiscencia (QL) y Electroquimioluminiscencia (EQL).*

2.2- Métodos inmunológicos:

Los métodos serológicos convencionales, como QL, EQL y ELISA, presentan confiabilidad dado que no son operador dependiente y tienen mayor sensibilidad y especificidad. Este tipo de pruebas tienen mayor confiabilidad dado que, como mencionamos, no están sometidas a subjetividad del operador.

Ventajas:

- *En general son técnicas de laboratorio relativamente sencillas y económicas, sobre todo ELISA*
- *Son métodos robustos, y no operador dependiente en cuanto a la visualización del resultado.*
- *Los resultados generalmente se pueden producir dentro de 1 a 3 horas después de recolectar una muestra de paciente.*

La OMS no recomienda el uso de pruebas de diagnóstico rápido de detección de anticuerpos, pero alienta la continuación del trabajo para establecer su utilidad en la vigilancia de enfermedades y la investigación epidemiológica.

Control de calidad

Los inmunoensayos por ELISA, Quimioluminiscencia y Electroquimioluminiscencia son métodos ampliamente utilizados en el laboratorio bioquímico. Los controles internos y externos, por ser en muchos casos determinaciones automatizadas o semi- automatizadas, siguen procedimientos ya conocidos llevados a cabo en todo laboratorio clínico por lo que no se considerarán aquí.



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

Desde este punto de vista, lo importante es focalizarnos en el control de calidad de métodos inmunocromatográficos (IC) que son pruebas cualitativas y como mencionamos, son las que más se ajustan a la denominación de pruebas rápidas

Control de calidad de pruebas rápidas

Como indican los documentos para el funcionamiento del laboratorio clínico todo analito determinado en un laboratorio debe tener control interno y evaluación externa de calidad para poder emitir resultados confiables. Las pruebas rápidas no son una excepción, por lo tanto deben tener un seguimiento de la trazabilidad y para ello deben contar con el soporte de programas de calidad que evalúen el desempeño de la prueba. Surge entonces la necesidad de asegurar la trazabilidad desde el momento de la producción del kit hasta la emisión de un resultado.

Los cartuchos deben controlarse con el control de calidad en el momento de la entrega de los mismos con múltiples niveles del material de control de calidad recomendado por el fabricante. Esta comprobación básica garantiza que los cartuchos funcionan según las especificaciones y no se dañaron durante el transporte. Los diferentes números de lote y tipos de cartuchos en la entrega deben verificarse por separado, y se debe analizar una muestra "representativa" seleccionada al azar. Una vez que se haya realizado esta verificación, no debería ser necesario realizar un control de calidad de los cartuchos nuevamente, siempre que el almacenamiento sea consistente con las recomendaciones del fabricante. Se recomienda que una muestra de control de calidad, de tercera opinión, se ejecute al menos mensualmente, en al menos un cartucho dentro de un grupo del mismo lote.

ASPECTOS BIOÉTICOS

Este es un tema al cual, quizás por la magnitud y la velocidad de la pandemia, no se le otorga la suficiente trascendencia. Sin embargo, consideramos imprescindible tener en cuenta los aspectos bioéticos, cuya efectivización práctica depende de si se atiende a un paciente en el laboratorio o si se trata de testeos masivos

En el primer caso, antes de la realización de un análisis, se debería solicitar:

- Orden médica



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

- Si el paciente concurre por su propia voluntad, sin el requisito anterior, es imprescindible contar con un consentimiento informado (ver ANEXO I) que contenga su decisión de que desea realizarse el estudio para Covid 19, el tipo de estudio que se va a realizar, con firma y fecha del paciente.

En testeos masivos, siempre es importante el consentimiento informado de las personas a quienes se les va a extraer la muestra y realizar el estudio, sea hisopado o muestra de sangre. Debe tenerse en cuenta que existen excepciones contempladas en la Ley 26529, cuyos artículos más importantes se adjuntan en el ANEXO II.

COMITÉ CIENTÍFICO PERMANENTE CUBRA



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

ANEXO I - INFORME TÉCNICO N° 2 – COMITÉ CIENTÍFICO PERMANENTE CUBRA (16/06/2020)

Propuesta de modelo de Consentimiento Informado para la realización de análisis para COVID 19

DATOS DEL LABORATORIO HABILITADO

- Domicilio:
- Director Técnico:
- Nombre completo:
- Matrícula profesional:
- Extraccionista:

DATOS DEL PACIENTE

- Nombre y apellido:
- DNI o Pasaporte:
- Fecha de nacimiento:
- Domicilio:

Dejo constancia que he sido informado de la prueba o pruebas de laboratorio que se me van a realizar para:

- Diagnóstico de infección actual por Covid 19
- Determinar si he estado infectado con anterioridad

(marcar lo que corresponda)

Se me hizo saber también que los resultados me serán informados y, asimismo, serán puestos en conocimiento de las autoridades sanitarias correspondientes

He podido realizar preguntas sobre el tipo de prueba que se me efectuará y las mismas han sido respondidas y las he comprendido.

Asimismo, he leído el presente formulario y he comprendido su significado.

Entiendo que, si el análisis que se me efectúa es para determinar infección actual y su resultado es positivo, se me informará inmediatamente acerca de las medidas a tomar respecto a aislamiento, consulta médica e información de los contactos que he tenido durante el período que la autoridad sanitaria determine.



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

Entiendo que es posible que, de acuerdo al resultado de las pruebas que se me realicen, puede ser necesario efectuar otros análisis confirmatorios o complementarios, en cuyo caso se me informará adecuadamente.

Prueba que se me realizará: (A completar por el Bioquímico)

En caso de tratarse de una persona con capacidades diferentes o incapaz de comprender este Consentimiento Informado, un familiar a cargo puede leerlo y firmarlo

Firma del paciente o familiar a cargo

Aclaración

DNI



Confederación Unificada Bioquímica de la República Argentina

PERSONERÍA JURÍDICA RESOLUCIÓN I.G.J. 358467 | Representaciones Nacionales:

IFCC

International Federation of Clinical
Chemistry and Laboratory Medicine

COLABIOCLI

Confederación Latinoamericana
de Bioquímica Clínica

ANEXO II - INFORME TÉCNICO N° 2 – COMITÉ CIENTÍFICO PERMANENTE CUBRA (16/06/2020)

Excepciones de la obligatoriedad al Modelo de Consentimiento informado

Ley de Derechos del Paciente N° 26.529

ARTICULO 6º — Obligatoriedad. Toda actuación profesional en el ámbito médico-sanitario, sea público o privado, requiere, con carácter general y dentro de los límites que se fijen por vía reglamentaria, el previo consentimiento informado del paciente.

ARTICULO 9º — Excepciones al consentimiento informado. El profesional de la salud quedará eximido de requerir el consentimiento informado en los siguientes casos:

- a) Cuando mediare grave peligro para la salud pública;
- b) Cuando mediare una situación de emergencia, con grave peligro para la salud o vida del paciente, y no pudiera dar el consentimiento por sí o a través de sus representantes legales.

Decreto Reglamentario N° 1089/2012

ARTICULO 9º.- Excepciones al consentimiento informado. Constituyen excepciones a la regla general de que el consentimiento debe ser dado por el paciente, a las prescriptas en los artículos 4º, 6º y 9º de la Ley N° 26.529, modificada por la Ley N° 26.742, que se reglamentan.

El grave peligro para la Salud Pública al que se refiere el inciso a) del artículo 9º de la Ley N° 26.529, modificada por la Ley N° 26.742, deberá estar declarado por la Autoridad Sanitaria correspondiente. Ante tal situación, *la negativa a un tratamiento o diagnóstico puede dar lugar a la pérdida de beneficios o derechos o a la imposición de algunos tratamientos o diagnósticos coactivamente, conforme a las legislaciones vigentes.*

Las excepciones establecidas en el presente artículo se acreditarán de conformidad a lo que establezca la reglamentación, las que deberán ser interpretadas con carácter restrictivo